

## 総説 (平成26年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究)

## 免疫抑制剤を用いた膀胱癌の発生・進展抑制のメカニズム解明

河 原 崇 司

横浜市立大学医学部 泌尿器科学

**要 旨：**免疫応答に関わる転写因子である NFATc1 が正常組織に比べ各種癌組織で発現が上昇しているとの報告が散見される。また諸説あるものの、疫学調査において腎不全による人工透析患者に比べ腎移植後に免疫抑制剤を服用していた患者の方が膀胱癌発生率が低下したと報告されている。しかしながら、そのメカニズムについては不明であった。NFATc1 は免疫抑制剤の主要標的であることから、免疫抑制剤による膀胱癌罹患率の減少に強く関わっていると推測される。本研究では、免疫抑制剤が NFATc1 を介して膀胱癌の発生・進展に抑制効果があるのかを検討した。

膀胱癌組織アレイを用い NFATc1 の発現を免疫組織学的染色により検討したところ、正常尿路上皮組織に比べ表在性膀胱腫瘍組織では有意に NFATc1 の発現が高かった ( $p<0.05$ )。また、膀胱癌全摘後の再発率は NFATc1 発現群で有意に高かった ( $p<0.01$ )。膀胱癌細胞株において、免疫抑制剤を刺激したところ、NFATc1 発現・活性が有意に低下した。また、免疫抑制剤の刺激により細胞増殖能(生存度の減少およびアポトーシスの増加)・創傷癒合能・細胞浸潤能の低下や MMP-2・MMP-9 の発現・活性の低下を認めた。しかし、免疫抑制剤の効果は、NFATc1-shRNA を強制発現させた細胞株では認められなかった。正常尿路上皮細胞株である SVHUC に発癌物質である methylcholanthrene (MCA) を暴露させたのちに免疫抑制剤を 6 週間刺激し続けた腫瘍発癌モデルで検討した。腫瘍化は、軟寒天を用いた足場形成能の獲得および NOD-SCID マウスにおける腫瘍定着率で評価した。膀胱癌発癌モデルでは、免疫抑制剤は足場形成能を有意に低下させた ( $p<0.01$ )。マウスにおいても、腫瘍定着率はコントロール群に比べて有意に低下した ( $p<0.01$ )。

NFATc1 の発現は、表剤性膀胱腫瘍で正常尿路上皮より有意に高く、浸潤癌の予後とも相関したことから、新規分子マーカーとなりうると考えられた。また免疫抑制剤は NFATc1 を介して膀胱癌の発生・進展を抑制したことから、新規治療法の可能性が示唆された。

**Key words:** 免疫抑制剤 (immune-suppressive agent), シクロスポリン (cyclosporine), タクロリムス (tacrolimus), NFATc1 (NFATc1), 膀胱癌 (bladder cancer)

## 膀胱癌と再発

膀胱癌の大きな特徴は再発を繰り返すこと、再発に伴い時に悪性度が高くなることであり、治療における大きな問題となっている。そのため、膀胱癌の発生・進展機構の解明と治療への応用について様々な検討が進められているが、いまだに効果的な治療方法の開発には至っていない。我々は膀胱癌の発生・進展におけるアンドロゲン受容体の重要性を世界に先駆けて報告しており、その

機構としてアンドロゲン受容体を介した転写因子である NFAT の発現制御が重要であることが膀胱癌細胞株におけるマイクロアレイの結果から示唆された。

## NFATc1 と腫瘍

NFAT は免疫に関わる転写因子として報告されており、主要な研究は免疫応答への関与についての検討のみである<sup>1)</sup>。また、免疫抑制剤であるカルシニューリンイニヒ

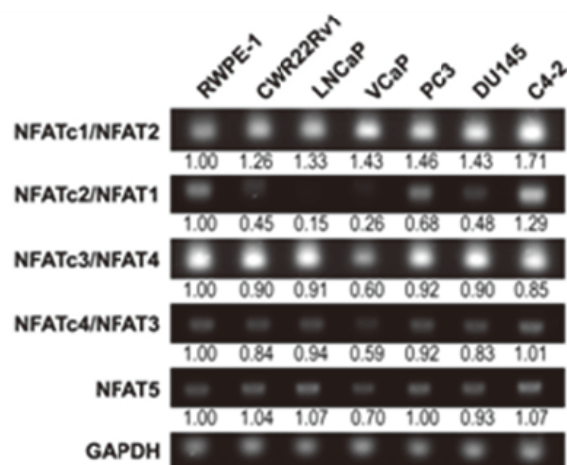


図 1

正常細胞と比較し、悪性度の高い前立腺癌細胞の方がNFATc1の発現が高値であった。

ビター（シクロスポリン・タクロリムス）はNFATの核内移行を抑えることで転写活性を阻害し、免疫応答を制御している<sup>2)</sup>。NFATと癌の関連性については、固形癌においてNFAT何らかの重要な役割を果たすことが報告されているが、詳細なメカニズムの解明には至っていない<sup>3)</sup>。更に、シクロスポリン・タクロリムスを用い膀胱癌治療の可能性についての検討は全くされていなかった。臨床研究の点では臓器移植患者後の各種癌発生率を調べた大規模試験結果から、膀胱癌の罹患率が移植後の免疫抑制剤使用によって減少することが報告されており、膀胱癌におけるNFATが発癌に関与しているのではと示唆された<sup>4)</sup>。膀胱癌は免疫抑制剤の使用で癌の進展を抑える数少ない癌種であるが、そのメカニズムは不明である。NFATにはc1-5までの5つのisoformがあり、特にc1が癌の進展に関与すると報告されている<sup>4)</sup>。その他、膀胱癌・肺癌等におけるNFATc1の発現について検討されているが、基礎研究と臨床研究を結び付ける詳細な報告はされていなかった。

### NFATc1の前立腺・膀胱腫瘍における発現

我々はこれまでの研究から免疫応答に関わる転写因子であるNFATが前立腺癌において強く発現しており、NFATのisoformの中でも特にNFATc1が重要な働きを担っていることを見出している（図1）<sup>5)</sup>。特にNFATc1は正常前立腺組織に比べて前立腺癌組織で高く発現しており、NFATc1高発現群は、病理組織学的分類とは独立した予後因子であることを突き止めている。正常および膀胱癌のヒト組織アレイを用いた結果では、正常細胞に比べ癌細胞では有意にNFATc1の発現が高かった。さらに膀胱癌細胞においても、NFATc1の発現が高い群ほど有意に予後不良な結果が得られた。（図2）

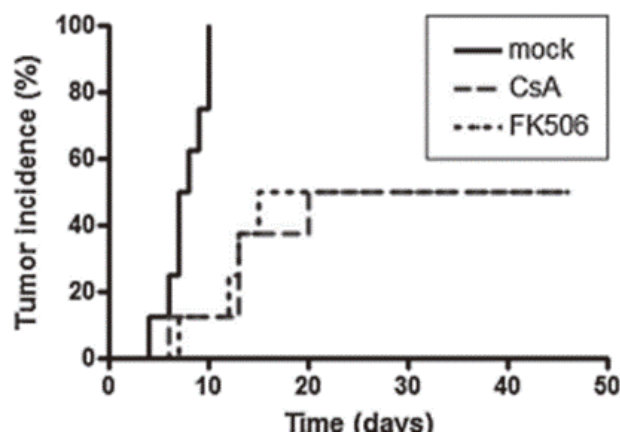


図 2

膀胱癌において、免疫抑制剤投与群で有意に発癌の発生率が低い傾向であった。

### NFATc1抑制による膀胱癌発癌進展抑制

膀胱癌におけるNFATの役割はわかっていない。本研究では膀胱癌細胞におけるNFATの機能解析を行った。免疫抑制剤であるシクロスポリンおよびタクロリムスを膀胱癌細胞に刺激すると、NFATc1の核内移行を妨げ、活性を低下させた。またNFATの下流であるCOX-2を免疫抑制剤は有意に阻害した。一方でNFATをノックダウンさせた細胞では免疫抑制剤による変化は見られなかった。以上より、膀胱癌においてNFATc1は癌の進展において重要な働きをしており、免疫抑制剤を用いてNFATc1を抑制させることが膀胱癌の新しい治療の可能性であることが示唆された<sup>6)</sup>。

つづいて、正常尿路上皮組織であるSVHUC細胞に癌化させる化学物質であるMCAを継続的に刺激する膀胱癌発癌モデルを用いて、NFATc1の膀胱癌発癌における影響を検討した。免疫抑制剤を作用した群では、足場形成能を有意に低下させた（ $p < 0.01$ ）。マウスにおいても、腫瘍定着率はコントロール群に比べて有意に低下した（ $p < 0.01$ ）<sup>7)</sup>。NFATc1を抑える免疫抑制剤を作用させると、がん遺伝子であるc-myc, cyclinD1, cyclinD3, cyclinEが抑えられる一方で、癌抑制遺伝子であるp53, p21, p27が増加していた。これらのことから、免疫抑制剤は膀胱癌において、癌の進展のみならず癌の発生も制御する可能性が示唆された。

### 結 語

免疫抑制剤を用いてNFATc1を抑制することで膀胱癌発生が抑制できる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR: Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, **241** (4862) : 202 – 205, 1988.
- 2) Crabtree GR, Olson EN: NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, **109** Suppl: S67 – 79, 2002.
- 3) Oum JH, Han J, Myung H, Hleb M, Sharma S, Park J: Molecular mechanism of NFAT family proteins for differential regulation of the IL-2 and TNF- $\alpha$  promoters. *Mol Cells*, **13** ( 1 ) : 77 – 84, 2002.
- 4) Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Jr., Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, Wolfe RA, Goodrich NP, Bayakly AR, Clarke CA et al: Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*, **306** (17) : 1891 – 1901, 2011.
- 5) Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Ishiguro H, Miyamoto H: The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate*, **75** ( 6 ) : 573 – 584, 2015.
- 6) Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Miyamoto Y, Netto GJ, Ishiguro H, Miyamoto H: Cyclosporine A and tacrolimus inhibit bladder cancer growth through down-regulation of NFATc1. *Oncotarget*, **6** ( 3 ) : 1582 – 1593, 2015.
- 7) Kawahara T, Kashiwagi E, Li Y, Zheng Y, Miyamoto Y, Netto GJ, Ishiguro H, Miyamoto H: Cyclosporine A and tacrolimus inhibit urothelial tumorigenesis. *Mol Carcinog*, **55** ( 2 ) : 161 – 169, 2016.

## Abstract

### NNUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T CELLS (NFAT) INDUCES BLADDER CANCER CELL PROLIFERATION

Takashi KAWAHARA

*Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine*

Nuclear factor of activated T cells (NFAT) was initially identified as an inducible nuclear factor that could bind the interleukin-2 (IL-2) promoter in activated T cells. NFAT has been extensively studied among the immune system transcription factors for two decades, however, recent findings have revealed that NFAT isoforms, especially NFATc1 and NFATc2, are also overexpressed in human solid tumors and hematologic malignancies. This study is the first to investigate the expression of NFATc1 in bladder cancer tissues and the anti-tumor effect using cyclosporine A (CsA) and tacrolimus (FK506) in human bladder cancer cell lines.

The NFATc1 pathway plays an important role in proliferation, migration, invasion, and apoptosis in bladder cancer. Our results also showed that NFATc1 is a potential tumor marker to predict recurrence in prostate cancer. Additionally, CsA and FK506 might be new targeted treatments for bladder cancer though their actions on the NFATc1 pathway.

